

CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA Y ESTRUCTURAL DE SUSTANCIAS HUMICAS

Grupo de Sevilla

— — — — —

Las sustancias húmicas del suelo poseen una estructura compleja y probablemente constituyan un conjunto de sustancias con cierta afinidad, mezcladas y unidas entre sí por distintos tipos de enlaces, de tal forma que las técnicas usuales empleadas en la química de los polímeros no han dado resultados muy satisfactorios hasta el momento.

Las discrepancias existentes en los resultados obtenidos se deben, entre otras razones, a las diferencias de criterios empleados sobre extracción, fraccionamiento y purificación. Este estado de la cuestión se ha agravado en los últimos años con la ampliación del concepto, al incorporarse al grupo de sustancias húmicas las aisladas de sedimentos, aguas continentales y marinas, carbones, etc.

Teniendo en cuenta tal amplitud, parecería necesario la utilización de unos parámetros o técnicas que permitieran delimitar los grupos y distinguir las fracciones húmicas según su origen, naturaleza o propiedades. A tal fin se han venido empleando tradicionalmente unos métodos de caracterización y degradación con el propósito de establecer una serie de diferencias. A continuación se mencionan y revisan tales métodos de análisis.

Composición elemental

Los elementos analizados son C, H, N y en menor escala S. El oxígeno se calcula por diferencia, aunque también en algunos casos se determina analíticamente. La principal fuente de error en este análisis es la humedad de las muestras. Según el método de obtención las sustancias húmicas suelen tener entre el 6 y 10 por ciento de humedad. La eliminación de és-

ta por calentamiento a 105°C produce, en algunos casos, una descomposición de grupos carboxilos e hidroxilos con eliminación de CO_2 y H_2O , por lo que se recomienda secar las muestras a vacío y 60°C .

En las muestras húmicas existen dos tipos de impurezas, una inorgánica, las cenizas, determinadas por combustión a 700°C durante 4 horas, y otra orgánica, debida a ciertas sustancias que se coextraen tales como polisacáridos, fenoles, etc.

Para un análisis estructural adecuado el contenido en cenizas no debe ser superior al 5 por ciento, estando el valor óptimo y deseable por debajo del 2 por ciento. En este laboratorio, siguiendo las recomendaciones dadas en la propuesta sobre extracción, se obtienen ácidos húmicos de esta calidad.

Desde el punto de vista estructural, parte del N presente en los ácidos húmicos es considerado por muchos autores como impureza presente en forma de proteínas y péptidos, y su contenido depende en gran medida del agente extractor empleado, dado que las sustancias nitrogenadas pueden unirse mediante distintos tipos de enlaces a determinadas unidades estructurales.

De los datos de análisis elemental se pueden deducir diversas razones, tanto atómicas como moleculares. Estas últimas proporcionan una idea del grado de oxidación (O/H) y condensación (C/H) de la molécula. Sin embargo, las razones atómicas son más utilizadas pues permiten el conocimiento aproximado del esqueleto carbonado de la molécula, sobre todo si se utilizan las razones corregidas, que son aquellas en las que se ha eliminado la parte proporcional de los elementos que se encuentran en grupos funcionales. También una representación de las razones atómicas H/C vs O/C sirve para seguir procesos de decarboxilación, demetanación, deshidratación, hidrogenación, oxidación, etc. (1).

Grupos funcionales

Normalmente la determinación de grupos funcionales se ha enfocado hacia aquellos que contienen O, no existiendo muchos datos sobre otros, tales como los que contienen N o S.

Los más importantes grupos oxigenados presentes en las sustancias húmicas son carboxilos, hidroxilos y carbonilos.

La acidez total se determina por la reacción de la muestra con un exceso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, bajo atmósfera de nitrógeno (2). El $\text{Ba}(\text{OH})_2$ que no reacciona se valora con una solución de ácido standard. Los valores medios para ácidos húmicos oscilan entre 6.5 y 8.5 meq/g y entre 12 y 14 meq/g para ácidos fúlvicos. En estos valores intervienen de una forma acusada el agente extractor empleado y el método de purificación seguido, de ahí la importancia que tiene la elección de uno y otro.

Los grupos carboxilos se determinan por reacción de las sustancias húmicas con un exceso de acetato cálcico (2). El ácido acético liberado se valora con NaOH standard. El valor medio es de 4.5 meq/g para ácidos húmicos y de 8.5 para ácidos fúlvicos.

Los hidroxilos totales se determinan por acetilación con anhídrido acético y piridina, aunque la ponencia recomienda ácido perclórico en lugar de piridina (2). El método que ofrece mejores resultados es el de aislamiento de la muestra acetilada y, mediante saponificación, valoración del ácido acético liberado. Los valores encontrados en la literatura oscilan entre 3.5 y 8.5 meq/g para ácidos húmicos y alrededor de 8 meq/g para ácidos fúlvicos.

El reparto de hidroxilos en fenólicos y alcohólicos depende de los valores anteriores, pues son determinaciones indirectas. Así, de la acidez total menos grupos carboxilos se

obtienen los hidroxilos fenólicos, e hidroxilos totales menos hidroxilos fenólicos da lugar a los hidroxilos alcohólicos.

Los carbonilos totales se determinan mediante reacción de la muestra con un exceso de hidroxilamina en un medio de metanol-2-propanol (2). El exceso de hidroxilamina se valora con solución standard de ácido perclórico. El valor medio tanto para ácidos húmicos como fúlvicos es de 2 meq/g.

Dado que las cantidades de muestra que se emplean para estas determinaciones son pequeñas, entre 50 y 100 mg, las valoraciones deben efectuarse cuidadosamente, pues un mínimo error repercute de manera acusada en el valor final. Se recomienda efectuar 3 repeticiones de cada determinación, como mínimo.

Una vez efectuadas todas estas determinaciones se encuentra que entre 80 y 100 del oxígeno se encuentra en estos grupos funcionales.

De los valores de grupos funcionales pueden extraerse muy pocas conclusiones, ya que no pueden aplicarse a la caracterización de fracciones húmicas de distintos tipos de suelos ni ninguna información estructural se desprende de ellos, habida cuenta de que las pequeñas diferencias no suelen ser significativas bajo un punto de vista estadístico. La mayor parte de las veces sólo supone el poseer unos datos más sin especial significación.

Métodos espectroscópicos

Tales métodos han sido ampliamente utilizados en el estudio de las sustancias húmicas, principalmente debido a la poca manipulación que requieren. Sin embargo, los datos que se obtienen de la mayoría de ellos no justifican su popularidad.

La obtención del espectro visible y UV no ha dado lugar

a ningún avance en cuanto a características estructurales, estando restringido su empleo al aspecto cuantitativo. Un parámetro empírico del que se ha querido extraer muchas consecuencias es la llamada razón E_4/E_6 (3), sin embargo su aplicación y resultados son dudosos.

La espectroscopía de IR ha sido y sigue siendo muy utilizada y la ponencia podría extenderse considerablemente en la discusión de esta técnica. Si se analiza a fondo se llega a la conclusión de que sólo dos bandas están perfectamente definidas, la de 2.900 cm^{-1} , atribuida a vibraciones de tensión C-H alifática y la banda a 1.725 cm^{-1} , atribuida a vibración de tensión del grupo C=O de COOH y a la que tal vez pudiera contribuir algún otro grupo. El resto de las bandas no están claramente asignadas y según los autores se adscriben a uno u otro grupo. Hoy día la información que proporciona el espectro IR se reduce casi exclusivamente a reacciones de formación de complejos y estudios de adsorciones (4).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear se ha empleado poco en el estudio de sustancias húmicas. Los resultados parecen indicar que, en el caso de resonancia protónica no hay protones aromáticos ni olefínicos y que existe una mayoría de protones resonantes debido a grupos metilos y metilenos y una pequeña parte debidos a grupos metoxilos (4). Esto parece indicar que los anillos aromáticos de las sustancias húmicas están totalmente sustituidos.

Una técnica muy moderna, y aplicada en este laboratorio, es la RMN de C-13 (5, 6). Los resultados obtenidos parecen prometedores, requiriéndose aún más estudios con sustancias modelo para la asignación de las bandas.

La espectroscopía de ESR basada en la medida de electrones desapareados en sustancias paramagnéticas tampoco ha dado mucho resultado, habiéndose puesto de manifiesto únicamente la presencia de radicales libres, pero sin haberse podido dilucidar si provienen de grupos semiquinónicos, hidro-

carburos polinucleares o radiales libres "atrapados" (7).

Por último, dentro de los métodos espectroscópicos está la aplicación de rayos X, pero al ser las sustancias húmicas compuestos de naturaleza amorfa, sólo se producen unas anchas bandas entre 3.5 y 4.5 Å, análogas a las que se producen en carbones (8).

Métodos físicos

La electroforesis se ha utilizado fundamentalmente como técnica semicuantitativa de separación de sustancias húmicas en función de parámetros tales como tamaño, carga y forma (9). Sin embargo, actualmente tiene un valor limitado por la pequeña cantidad de muestra que se puede fraccionar, habiendo sido superada por otras técnicas de separación como la cromatografía de gel filtración, por ejemplo.

La determinación del peso molecular de las fracciones húmicas tienen un indudable interés práctico. Una correcta evaluación del papel de las sustancias húmicas en los procesos edafogénicos (migración de ácidos fúlvicos, su distribución en el perfil, etc.) y en la fertilidad del suelo requiere tanto la determinación de las cantidades totales como su distribución en peso molecular. Los valores encontrados en la literatura oscilan entre algunos cientos y varios millones. Esta dispersidad es imputable, por un lado a la diversidad de técnicas empleadas y por otro a la distinta naturaleza de las muestras utilizadas.

La filtración por geles de Sephadex es una técnica simple, poco costosa y muy eficaz en el estudio de polímeros, utilizada para el cálculo del peso molecular-promedio ponderal y la distribución de fracciones húmicas.

Puesto que las dificultades que plantean las importantes interacciones gel-sustancias húmicas pueden superarse mediante una adecuada elección de las condiciones operativas,

una primera exigencia del empleo de la filtración por gel sería la de seguir fielmente la metodología propuesta por Swift y Posner (10). No obstante, para la utilización de esta técnica en el cálculo del peso molecular es necesario el calibrado previo de los geles con fracciones de ácidos húmicos o fúlvicos de peso moleculares conocidos previamente mediante un método independiente (ultracentrífuga, difusión, osmometría, etc.), ya que el poder de separación de los geles ha sido determinado por los fabricantes con proteínas y polisacáridos y lógicamente no son válidos para sustancias húmicas, de tamaño, forma y carga diferente a los materiales usados para la calibración.

En cualquier caso, los valores de peso molecular obtenidos por filtración por gel deben ser verificados por cualquier otro método independiente, de acuerdo con la opinión generalizada de muchos autores.

La técnica de filtración por gel ha sido también empleada con el propósito exclusivo de obtener subfracciones húmicas de menor polidispersidad que las originales, que pudieran utilizarse como material de partida en investigaciones estructurales. El método es muy laborioso, hasta obtener suficiente cantidad de estas subfracciones bien definidas, al menos cromatográficamente. Nuestra experiencia particular y la de otros autores no es muy alentadora en este sentido, ya que estas subfracciones poseen aún una elevada complejidad, según se desprende de sus propiedades físico-químicas y espectrales.

Por último citar que la filtración por gel se ha empleado para la eliminación de impurezas orgánicas (polisacáridos) y fraccionamiento de extractos alcalinos de suelos.

Métodos degradativos

Hasta hoy no se ha encontrado un método degradativo que sea capaz de arrojar luz sobre la naturaleza total o global

de la molécula húmica, sino más bien de fragmentos o pequeñas porciones de ésta. Ello parece deberse a una serie de factores tales como la naturaleza compleja y la heterogeneidad, que hace que los métodos degradativos sólo afecten a determinados enlaces, fragmentos o estructuras y no a su totalidad, de forma que no puede decirse que los compuestos o formación obtenida sean representativos y característicos de la molécula completa.

Existen una gran cantidad de métodos degradativos cuya enumeración y discusión sería prohibitiva en el ámbito de una corta ponencia. Por ello sólo revisaremos los más significativos.

La hidrólisis con ClH 6N libera hasta un 50 por ciento del material húmico procedentes de proteínas, polipéptidos, polisacáridos, así como otros materiales adsorbidos a la molécula húmica, entre ellos ligninas y polifenoles (10). Esta hidrólisis no libera completamente el nitrógeno de la molécula, creyéndose que los aminoácidos N-terminales de los péptidos quedan ligados covalentemente a núcleos fenólicos y esta unión resiste la hidrólisis. Tres hidrólisis ácidas en sesiones de 24 horas fueron ineficaces para liberar totalmente el nitrógeno, extrayéndose sólo un 70 por ciento en ácidos húmicos de vertisuelos. Sin embargo, algunos autores han informado que tres hidrólisis, la última con adición de un 2 por ciento de H_2O_2 liberan un 99.9 por ciento del nitrógeno húmico. Estos resultados no pudieron ser reproducidos en nuestro laboratorio con ácidos húmicos de suelos andaluces, donde aún permanecieron entre un 23 y 54 por ciento del nitrógeno.

La hidrólisis ácida no afecta sensiblemente a la estructura húmica, dato confirmado mediante degradaciones antes y después del tratamiento. Ha de evaluarse si es preferible una mínima alteración de la estructura (condensación?) como contrapartida de la eliminación de todo el material contaminante. Nosotros pensamos que cualquier estudio estructural ha de efectuarse sobre ácidos húmicos hidrolizados.

Uno de los mayores inconvenientes de la presencia conjunta de polisacáridos y proteínas es la formación de melanoidinas. Si tales sustancias se calientan, bien en condiciones ácidas o alcalinas, conducen inevitablemente a la formación de melanoidinas, artefactos que enmascaran y alteran la estructura húmica.

La reducción con amalgama de sodio fue introducida modernamente en los estudios de ácidos húmicos (11), si bien en los años 30 ya existían algunas referencias. Esta degradación liberó entre 30 y 35 por ciento de sustancias solubles en éter, en su mayoría fenoles y ácidos fenolcarboxílicos. Los primeros trabajos de amalgama (12) obtuvieron unos elevados rendimientos en productos de degradación, que posteriormente no han podido ser reproducidos. Estudiándose los mecanismos de reacción y las condiciones en que se llevaba a cabo la degradación se vió que las diferencias en rendimientos podían atribuirse a diferencias en el protocolo. Las condiciones óptimas han sido expuestas por Piper y Posner (13), condiciones que coincidieron con las de los primeros trabajos y no con las de los posteriores.

La degradación por amalgama de sodio afecta a enlaces C-O-C y C-C entre anillos aromáticos, pero no a los unidos por puentes metilénicos. La presencia de fenoles derivados de la lignina, tales como ácidos ferúlico, siríngico y vanílico puede atribuirse a ligninas coextraídas con los ácidos húmicos, ya que las degradaciones no se llevaron a cabo con materiales purificados. La identidad entre los fenoles liberados por hidrólisis ácida y amalgama añade más evidencia a este hecho.

La oxidación con MnO_4K ha sido el método más extensamente aplicado a las sustancias húmicas, principalmente por Schnitzer y colaboradores (14). El método libera compuestos alifáticos, fenoles y ácidos bencenopqlicarboxílicos, siendo estos últimos los presentes en mayor cantidad, lo que ha llevado a Schnitzer a considerar que estos compuestos forman una parte importante de la estructura de las sustancias húmi-

cas. Sin embargo, tales ácidos bencenopolicarboxílicos son productos de degradación que suelen estar lejos de las unidades estructurales, ya que éstas, debido al proceso de oxidación, han sido profundamente alteradas y oxidadas y, generalmente, no pueden dar una evidencia directa del tipo de estructura de la que deriva. Es bien sabido que la lignina, un polímero de alcoholes fenilpropílicos producen por oxidación con permanganato una serie de ácidos bencepolicarboxílicos, compuestos que no están presentes en su estructura.

Otra de las objeciones a estos trabajos es el afán de dar resultados cuantitativos, cuando estos, la mayoría de las veces, están basados en especulaciones, teniendo en cuenta las considerables pérdidas de material que suelen llevar todos los procesos de aislamiento, separación y purificación de los productos de degradación. En este sentido han aparecido algunos trabajos criticando tales métodos (15).

En los últimos años se están empleando degradaciones térmicas para el estudio de las sustancias húmicas, fundamentalmente pirólisis-cromatografía de gases y pirólisis-cromatografía de gases-espectrometría de masas, técnicas que se usan habitualmente en nuestros laboratorios. Concretándonos a la pirólisis-cromatografía de gases-espectrometría de masas se ha puesto de manifiesto la presencia de productos de pirólisis procedentes de polisacáridos, proteínas, ligninas, alcanos, ácidos grasos, así como una gran variedad de compuestos aromáticos (16, 17, 18). La hidrólisis ácida liberó tales compuestos, en su mayoría, observándose en los pirogramas sólo los compuestos aromáticos y pocos alcanos, que podrían constituir parte de las unidades estructurales de la molécula.

Mientras que la mayoría de los métodos degradativos pueden aplicarse sin mayores problemas a los ácidos húmicos, los ácidos fúlvicos presentan limitaciones, así por ejemplo, la hidrólisis ácida destruye casi completamente la estructura de estos últimos, liberando la mayoría de sus componentes. Si

esto es así, parece difícil entender como otros métodos mucho más drásticos, como pueden ser los oxidativos, se aplican a tales moléculas. Incluso en la pirólisis, los ácidos fúlvicos se han mostrado difíciles de estudiar, por ello esta fracción requiere una nueva visión y nuevas bases para un estudio más lógico y adecuado.

Como resumen final y recapitulativo creemos que los métodos de caracterización y degradación no pueden proporcionar datos para identificar determinado ácido húmico de un suelo respecto a otro, por ejemplo, ya que la mayoría, si no todos, presentan mínimas diferencias en lo que respecta a composición elemental, grupos funcionales y métodos espectroscópicos, y muy pocas diferencias cuantitativas entre los productos de degradación. Por tanto parece que los métodos degradativos sólo pueden proporcionar información sobre estructuras químicas, pero no servirían como método de identificación, al menos entre sustancias húmicas de un mismo grupo. Posiblemente podrían establecerse o estudiarse las diferencias entre sustancias húmicas de distintos grupos (suelos, sedimentos, aguas naturales, carbones, etc.).

BIBLIOGRAFIA

1. ISHIWATARI, R. 1971. Organic polymers in recent sediments - Chemical nature and fate in geological environment. Dr. Sci. Thesis, University of Tokyo.
2. SCHNITZER, M. 1975. Chemical, spectroscopic and thermal methods for the characterization of humic substances. Proc. Int. Meet. Humic Substances, Nieuwershuis, 1972, Pudoc, Wageningen, pp. 293-310.
3. CHEN, Y.; SENESI, N. y SCHNITZER, M. 1977. Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. Soil Sci. Soc. Am. J. 41, 352-358.
4. SCHNITZER, M. 1971. Characterization of humic constituents by spectroscopy. En "Soil Biochemistry", vol 2,

- A.D. McLaren y J. Skujins, eds. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 60-95.
5. GONZALEZ-VILA, F.J.; LENTZ, H. y LUDEMANN, H.D. 1976. FT-C-13 nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 72, 1063-1070.
 6. GONZALEZ-VILA, F.J.; SÁIZ-JIMENEZ, C.; LENTZ, H. y LUDEMANN, H.D. 1978. C-13 nuclear magnetic resonance of fungal melanins. *Z. Naturforsch.* 33c, 291-293.
 7. STEELINK, C. y TOLLIN, G. 1967. Free radicals in soil. En "Soil Biochemistry", vol 1, A.D. McLaren y G.H. Peterson, eds. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 147-169.
 8. POLLACK, S.S.; LENTZ, H. y ZIECHMANN, W. 1971. X-ray diffraction study of humic acids. *Soil Sci.* 112, 318-324.
 9. SWIFT, R.S. y POSNER, A.M. 1971. Gel chromatography of humic acid. *J. Soil Sci.* 22, 237-249.
 10. RIFFALDI, R. y SCHNITZER, M. 1973. Effects of 6N HCl hydrolysis on the analytical characteristics and chemical structure of humic acids. *Soil Sci.* 115, 349-356.
 11. MARTIN, J.P.; HAIDER, K. y SÁIZ-JIMENEZ, C. 1974. Sodium amalgam reductive degradation of fungal and model phenolic polymers, soil humic acids and simple phenolic compounds. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 38, 760-765.
 12. BURGESS, N.A.; HURST, H.M. y WALKDEN, B. 1964. The phenolic constituents of humic acid and their

- relation to the lignin of the plant cover. *Geochim. Cosmochim. Acta* 28, 1547-1554.
13. PIPER, T.J. y POSNER, A.M. 1972. Sodium amalgam reduction of humic acid. I. An evaluation of the method. *Soil Biol. Biochem.* 4, 513-523.
 14. SCHNITZER, M. 1977. Recent findings on the characterization of humic substances extracted from soils from widely differing climatic zones. *Soil Organic Matter Studies*, vol. II, IAEA, Vienna, pp. 117-132.
 15. MAXIMOV, O.B.; SHVETS, T.V. y ELKIN, Yu.N. 1977. On permanganate oxidation of humic acids. *Geoderma*, 19, 63-78.
 16. MARTIN, F.; SÁIZ-JIMENEZ, C. y CERT, A. 1977. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of soil humic fractions. I. The low boiling point compounds. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41, 1114-1118.
 17. MARTIN, F.; SÁIZ-JIMENEZ, C. y GONZALEZ-VILA, F.J. 1979. Degradation thermique de lignine et acides humiques. *Journées d'Etude du Groupe Polypheols*, Nancy (en prensa).
 18. MARTIN, F.; SÁIZ-JIMENEZ, C. y CERT, A. 1979. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of soil humic fractions. II. The high boiling point compounds. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43 (en prensa).
- F. Martín Martínez
C. Sáiz Jiménez
F.J. González Vila

DISCUSION

Dr. Gavilán Rodríguez: No se puede rebajar el contenido de cenizas a menos del 2 por ciento?

Dr. Martín Martínez: En ácidos húmicos de suelos difícilmente puede bajarse de esa cifra, ahora bien en ácidos húmicos de carbones sí.

Dr. Suso Moliner: Respecto a la determinación de la humedad, nosotros la determinamos por el método de Karl-Fischer y obtenemos buenos resultados. Con ácido sulfúrico hemos llegado a necesitar 32 días.

Dra. Carballas Fernández: Sobre la composición elemental de los ácidos húmicos, aunque sé que varios autores consideran el nitrógeno como una impureza, no estoy de acuerdo en absoluto con esta idea, pienso que el nitrógeno es un elemento constitutivo de los ácidos húmicos. Prueba de ello es que después de someterlos a hidrólisis ácida con HCl 6N permanece aún nitrógeno en su molécula.

Dr. Martín Martínez: En algunos ácidos húmicos mediante métodos físicos se puede rebajar el contenido en nitrógeno hasta cantidades ínfimas como efectuaron Roulet y Ruchti por gel filtración.

Dra. Carballas Fernández: En cuanto al método de purificación, nosotros precipitamos los ácidos húmicos repetidas veces, luego dializamos, posteriormente los pasamos por resinas y los liofilizamos, conservándolos después en frascos de color topacio, dentro de un desecador. Hemos visto que de esta forma, al cabo de 2 años, los datos analíticos son reproducibles.

Dr. González Vila: La reprecipitación es fundamental, en el

protocolo se indica una sola vez, pero realmente se efectúa 3 ó 4 veces.

Dr. Costa Yague: ¿Qué porcentaje de ácidos húmicos se dializa?

Dr. Sáiz Jiménez: Lo que se dializa son fundamentalmente ácidos fúlvicos que despreciamos.

Dr. Ortega Sanchez: Parece que todo el interés se centra en disminuir el contenido en cenizas. ¿Es que los ácidos húmicos no tienen parte mineral?

Dr. Gavilán Rodríguez: Desde un punto de vista químico los ácidos húmicos no tienen parte mineral, si no serían sales.

Dr. Ortega Sanchez: Es que en los suelos no existen minerales? Si los ácidos húmicos se forman por transformación de restos vegetales y éstos tienen minerales ¿por qué eliminarlos?

Dr. Sáiz Jimenez: Las cenizas no pueden considerarse parte constituyente de los ácidos húmicos. En el proceso de formación de ácidos húmicos la celulosa y lignina son transformadas microbiológicamente originando unidades de partida o precursores. Estos, una vez formados, pueden ligarse a la parte mineral del suelo. Los minerales no son parte fundamental de las moléculas húmicas, como lo demuestra la síntesis química de polímeros fenólicos y microbiológica de melaninas, prácticamente sin cenizas.

Dra. Carballas Fernández: Volviendo a la hidrólisis ácida, hemos visto que la cantidad de nitrógeno hidrolizable depende del tipo de humus y de su génesis. Nosotros hemos tratado de poner de manifiesto las diferencias de un humus formado a partir de nogal, con

otro de nogal-pradera y otro de pradera solo; en todas las técnicas empleadas para la caracterización de las fracciones no encontramos diferencias apreciables, pero cuando se empleó la hidrólisis ácida, se vió la influencia de la pradera, al liberar más nitrógeno que el formado bajo nogal, siendo el de nogal-pradera intermedio. Creemos incluso que el % de N hidrolizable puede ser un índice de tanto valor como la relación C/N.

Dr. Gavilán Rodríguez: En ácidos húmicos de lignito el nitrógeno se elimina en forma de aminoácidos, permaneciendo otro nitrógeno en forma de heterociclos.

Dr. González Vila: En cuanto al empleo de técnicas modernas, creo que la aplicación de la RMN de C-13 puede ser muy interesante para el conocimiento de la estructura de los ácidos húmicos.

Dr. Polo Sanchez: Soy pesimista respecto a que la aplicación de esta técnica permita obtener resultados positivos sobre la estructura de los ácidos húmicos.

Dr. González Vila: Considero que si se afrontara el estudio de polímeros modelo y de fenoles por esta técnica, los resultados se podrían extrapolar a los ácidos húmicos.

Dra. Carballas Fernández: Respecto a la información dada por la técnica de filtración por gel, no debe hablarse de peso molecular sino de tamaño molecular. Los ácidos húmicos y fúlvicos están formados por polímeros de distinto grado de condensación, por lo que para conocer su peso molecular habría que calcular la curva de distribución de pesos moleculares separando los ácidos húmicos en fracciones y determinando el peso molecular de cada una de éstas. Como esto es casi imposible, lo que se hace es calcular el peso molecular promedio en peso o en número.